

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-190707

⑬ Int. Cl.

A 61 K 7/26
35/74

識別記号

ACK

庁内整理番号

7133-4C
7138-4C

⑭ 公開

昭和60年(1985)9月28日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全10頁)

⑮ 発明の名称 抗う蝕剤

⑯ 特 願 昭59-43829

⑰ 出 願 昭59(1984)3月9日

⑱ 発 明 者 河 合 康 雄 厚木市毛利台2の8の12
⑲ 発 明 者 石 原 一 興 東京都千代田区内神田2-13-7
⑳ 出 願 人 株式会社アドバンス開発研究所 東京都中央区日本橋小舟町5番7号

11月 糸川 昭

1. 発明の名称

抗う蝕剤

2. 特許請求の範囲

- (1) ストレプトコッカス属又はラクトバチルス属に属する微生物の菌体及び/又は水抽出物を有効成分として含有することを特徴とする抗う蝕剤。
- (2) 前記微生物がストレプトコッカス・フェシウム、ストレプトコッカス・イクイナス、ラクトバチルス・ファーメントム及びラクトバチルス・サリバリウスであることを更に特徴とする特許請求の範囲第(1)項に記載の抗う蝕剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は抗う蝕剤、口腔用組成物及び抗う蝕性飲食品等に関する。

主たるう蝕原因菌であるストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)に対する抗菌性物質としては各種バクテリオリシンを始めとして幾つかが既に提案されているが、例えば腸内細菌に対する影響等の副作用につき実質的に未解明であり、日常的服用に於いて必ずしも安全であるとはなし難いもの

であるためこれらは未だ実用に供せられていない。

上記に鑑み本発明者らは鋭意研究の結果、健康人腸内細菌由来の乳酸菌々体乃至その水抽出物がS・ミュータンスに対し強い抗菌活性を有すること及びこれら乳酸菌々体乃至水抽出物は腸内細菌に対する影響も含めて経口投与では実質的に全然無毒性であることを知見し、本発明に到達したものである。

以下、本発明に於いて使用され得る微生物の種類と菌学的性質、抗う蝕剤の調製、抗菌活性及び仕様態様等につき詳細に分説する。

微 生 物

ストレプトコッカス属又はラクトバチルス属に属する各種微生物が使用され得、就中、ストレプトコッカス・フェシウム(*Streptococcus faecium*)、ストレプトコッカス・イクイナス(*Streptococcus equinus*)、ラクトバチルス・ファーメントム(*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバチルス・サリバリウス(*Lactobacillus salivarius*)等を好適なものとして例示し得る。ここで本発明に於いて特に有用な具体的菌株例を微工研受託番号と共に表示すれば下記第1表の通りである。

第 1 表

| 菌株名 | 微生物受託番号 |
|-----------------------------|-------------|
| <i>L. salivarius</i> AD0001 | FERM P-7537 |
| <i>L. fermentum</i> AD0002 | ・ -7539 |
| <i>S. equinus</i> AD8005 | ・ -7540 |
| <i>S. faecium</i> AD1051 | ・ -7536 |
| <i>S. faecium</i> AD1050 | ・ -7538 |

上記各菌株のスクリーニング方法、菌学的性質につき要約して示せば次の通りである。

1. スクリーニング方法

Watanabe, T., et al., Studies on streptococci. I. Distribution of fecal streptococci in man. Microbiol. Immunol. 25 257-269(1981)に記載の方法に準ずる。

すなわち、上記文献に記載の通り、健康人のフーシーズをKMN agar 及びLBS agar に塗抹、好氣的条件下で37℃、48~72時間培養し、生成コロニーをカウント、無作為にいろいろ、コロニー形、カタラーゼ陰性、グラム染色陽性球菌及び桿菌を分離し、生理的、生化学的性状を検査して分類同定した。

2. 分離乳酸菌の同定

ストレプトコッカス属細菌の選択培地KMN寒天培地、ラクトバチルス属細菌の選択培地LBS寒天培地(第2表参照)上のコロニーの形状、グラム染色性、形態、生理生化学的性状により下記文献1)~5)を参照して同定した。

第 2 表

KMN培地(Red-Kanamycin-milk agar)の組成

| | | |
|-----------|-------|--------------------|
| トリプトース | 15g | pH 6.5 121℃ 10' |
| 肉エキス | 3g | |
| アジ化ナトリウム | 0.2g | |
| 食塩 | 5g | |
| 寒天 | 18g | |
| 蒸留水 | 500ml | |
| スキムミルク | 16g | 100℃ 1hr |
| ニュートラルレッド | 40mg | |
| 蒸留水 | 200ml | |
| カナマイシン | 24mg | |

別減菌後、合し平板とする

LBS培地の組成

| | | |
|------------------|--------|--------------------------|
| LBS agar 粉末(BBL) | 84g | pH 5.5 ± 2 115℃ 15'滅菌 |
| トマトジュース | 200ml | |
| 氷酢酸 | 1.32ml | |
| 蒸留水 | 800ml | |

*) 参考文献

- 1) 光岡知足：臨床と細菌，2(3)，(197)55-(235)93, 1975
- 2) 光岡知足：日本細菌学雑誌，24(6)，261-280, 1969
- 3) T. Watanabe, H. Shimohashi, Y. Kawai, M. Muti：25(3)，257-269, 1981
- 4) R. H. Deibel, D. E. Lake, C. F. Nieven, Jr.：J. Bacteriol. 86, 1275-1282, 1963
- 5) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 490-509

同定の根拠とした菌学的性質を要約して示せば下記第3乃至7表の通りである。

第 3 表

| 菌株名 | 菌株番号 | 同定根拠となる菌学的性質 | | | | | | Lactobacillus salivarius |
|------------|--------|--------------|-----------|------|-----|-----|-----|--------------------------|
| | | カタラーゼ | コリネバクテリウム | 乳酸発酵 | 糖分解 | 糖利用 | 糖同化 | |
| LBS 上のコロニー | AD0001 | + | + | + | + | + | + | + |
| | AD0002 | + | + | + | + | + | + | + |
| | AD8005 | + | + | + | + | + | + | + |
| | AD1051 | + | + | + | + | + | + | + |
| | AD1050 | + | + | + | + | + | + | + |
| | AD0001 | + | + | + | + | + | + | + |
| KMN 上のコロニー | AD0001 | + | + | + | + | + | + | + |
| | AD0002 | + | + | + | + | + | + | + |
| | AD8005 | + | + | + | + | + | + | + |
| | AD1051 | + | + | + | + | + | + | + |
| | AD1050 | + | + | + | + | + | + | + |
| | AD0001 | + | + | + | + | + | + | + |

+: 陽性, -: 陰性, R: リトマス還元, L: リトマス増色, A: リトマス中和, CR: リトマス可逆性増色, AC: リトマス可逆性中和, CR+: リトマス可逆性増色と中和の両方, CR-: リトマス可逆性増色と中和の両方なし

3. 培養方法

これらの微生物の培養は前出各文献にも示す通りの常法によるものであるが、例えばロゴサ(Rogosa)液体培地(注)にて好氣的に静置培養し、得られた培養液を遠心分離してその菌体が採集される。

(注)

ロゴサ液体培地の組成

蒸留水1ℓ中に

| | |
|--------------------------------------|-------|
| トリブチケース | 10g |
| 酵母エキス | 5g |
| トリプトース | 3g |
| K ₂ HPO ₄ | 3g |
| KH ₂ PO ₄ | 3g |
| クエン酸三アンモニウム | 2g |
| ツイーン80 | 1g |
| グルコース | 20g |
| システイン塩酸塩 | 0.2g |
| *塩類溶液 | 5ml |
| (pH7.121℃ 15分間加熱滅菌) | |
| *塩類溶液蒸留水100mlに | |
| MgSO ₄ ・7H ₂ O | 11.5g |
| FeSO ₄ ・7H ₂ O | 0.68g |
| MnSO ₄ ・2H ₂ O | 2.4g |

処理(例えば15KC、60分)した各種滅菌処理菌体も又、本発明抗う蝕剤の有効成分として使用され得る。更に、これら滅菌処理菌体を水抽出処理に付しその水可溶性成分として目的活性成分を得るようにしてもよい。

抗う蝕活性

1. 抗菌活性

後記実験例に示す通り、本発明抗う蝕剤はS・ミュータンス菌の増殖を極めて効果的に抑制乃至阻害する。

他方、腸内細菌の主要乳酸菌(ストレプトコッカス・フェカリス、同・フェシウム、ラクトバチルス・ファーメントム、同・アシドフィラス、ビフィドバクテリウム(アドレッセンテス、インファンテス、ビフィダム、プレーベの4種)及び大腸菌には実質的に阻害効果を有しないという選択特異的抗菌スペクトルを示す。

2. 毒性

経口では実質的に全然無毒性であり、そのLD₅₀値は熱水抽出物乃至滅菌体として約6mg/マウス(腹腔内投与)以上であった。

使用態様

本発明抗う蝕剤は歯みがき剤、含嗽剤、トローチ剤、チューイ

抗う蝕剤の調製

本発明抗う蝕剤は前記各微生物の各種滅菌処理菌体又はその水抽出成分を有効成分とするものであるが、その典型的調製方法の幾つかにつき例示すれば次の通りである。

1. 熱水抽出処理

採集菌体を80~130℃、より好ましくは100~125℃、数分~数時間滅菌を兼ねた加圧乃至非加圧熱水抽出処理に付し、遠心分離処理等により水不溶固型分を除去して水溶性目的活性成分が得られる。

尚、抽出溶媒としては通常の生理食塩水(0.85%NaCl水溶液、等)のみならず所定pH値に調整された各種緩衝液、各種塩類溶液、水/アルコール>1/3(重量比)の程度の水:アルコール(メタノール、エタノール等の低級アルコール)混合溶媒等、各種水性溶媒も又同様に使用され得る。

更に、採集菌体を前記滅菌熱水抽出処理に付した全体を、遠心分離等の固型分除去処理に更に付することなくそのまま凍結乾燥、減圧乾燥、噴霧乾燥粉末等としたものも又、本発明抗う蝕剤として有用なものであることが付言される。

2. 滅菌処理

採集菌体を噴霧乾燥等の加熱滅菌処理し、或いは超音波破壊

シグマ等々の各種う蝕予防・抑制口腔用組成物として或いは通常の広汎な飲食物に添加されてう蝕抑制・予防性飲食物の形態で好適に使用され得るものであるが、その使用量は処理菌体乃至水抽出物として通常、0.001~10重量%(乾燥重量換算)程度である。

以下、実験例により本発明をより詳細に説明する。

実験例

1. ストレプトコッカス・ミュータンス増殖阻害作用

方法)

ロゴサ(Rogosa)液体培地100容に、生菌数濃度およそ10⁶/mlとなるよう、本発明各乳酸菌を接種し、15~24時間37℃で培養した。培養後、遠心分離により菌液を、菌液を約20容の0.85%食塩水に懸濁し、再び菌液する事を2回くり返し、洗浄菌体を集めた。これを1容の蒸留水中に懸濁し、115~121℃で10~15分間オートクレーブで加熱した。次いで遠心分離を行ない、その上清を凍結乾燥または加熱乾燥(110℃中)し、試料とした。

この試料の無菌溶液(試料を水に溶解し、pHを7にあわせ、121℃ 15分間オートクレーブ滅菌あるいはノンブレンフィルターで除菌したもの)をロゴサ液体培地またはトッド・ヒュ

ーイット(Todd-Hewitt)液体培地に無菌的に添加した、添加後、培地濃度は添加前の1/2となるよう、また試料濃度は望みの濃度になるよう適宜減菌蒸留水を加えた。これにストレプトコッカス・ミュータンス8148菌株(予防衛生研究所より分与)を生菌数濃度 10^8 /ml程度接種し、接種後24時間までの生菌数濃度を経時的に測定した。対象としては試料にかえて、0.85%食塩水を添加した。

*) 蒸留水1ℓ中に下記組成比(重量部)の混合物の凍結乾燥

物30gを溶解

牛心臓抽出液 500.0

ペプトン 20.0

デキストロース 2.0

塩化ナトリウム 2.0

リン酸二ナトリウム 0.4

炭酸ナトリウム 2.5

(pH7.8±, 121℃ 15分間加熱滅菌; Updyke et al., Applied Microbiol., 2: 117.

1954: カタログNo. BBL 11735)

ここで、熱水抽出物の抽出液中濃度を示せば下記第8表の通りである。

第8表

| | full growth時生菌数 | 菌体+培養液1/100 容DMにて抽出後の濃度 |
|---------------------|--------------------|----------------------------|
| L.ファーノンタム AD0002 | 10^{10} cells/ml | 2.0% |
| L.サリバリウス AD0001 | 10^{10} cells/ml | 2.0% |
| S.フェシウム AD1050 | 10^{11} cells/ml | 1.5% |
| S.イクイナス AD8005 | 10^{10} cells/ml | 1.0% |
| S.フェシウム AD1051 | 10^{10} cells/ml | 1.5% |

結果)

第1乃至5図に要約して示す通り、ストレプトコッカス・フェシウム、ストレプトコッカス・イクイナス、ラクトバチルス・ファーノンタム、ラクトバチルス・サリバリウスのいずれの菌体の熱水抽出物のストレプトコッカス・ミュータンスに対する増殖阻害作用も、熱水抽出物濃度に依存した。ストレプトコッカス・フェシウムの熱水抽出物は濃度2%で、24時間ほぼ完全に、濃度1%で12時間ほぼ完全に、また濃度0.5%でも

12時間目に95%以上ストレプトコッカス・ミュータンスの増殖を阻害した。ストレプトコッカス・イクイナスの熱水抽出物は濃度1%で、24時間完全に増殖を抑制し、濃度2%では、弱い殺菌的作用もみられた。ラクトバチルス・ファーノンタムの熱水抽出物は濃度2.5%以上で殺菌的に作用した。ラクトバチルス・サリバリウスの熱水抽出物は濃度2.5%以上で、24時間完全に増殖を阻害し、1.5%でも95%以上の増殖阻害を示した。また、第9表にこれら乳酸菌々体熱水抽出物のストレプトコッカス・ミュータンスの分裂速度への影響を示した。完全に増殖阻害を行わない濃度でも、分裂速度を大巾に遅延させていた。

又、加熱滅菌体菌末等の場合も、全く同等の結果が得られた。

尚、図中、縦軸はS. ミュータンス生菌濃度($\log \cdot \text{ml}^{-1}$)、

横軸は培養時間(時間)であり、菌種は符号で示してある。

第9表

| 阻害菌濃度(%) | 阻 害 菌 種 No. | | | | | 58 |
|----------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----|
| | L.ファーノンタム AD0002 | L.サリバリウス AD0001 | S.フェシウム AD1051 | S.フェシウム AD1050 | S.イクイナス AD8005 | |
| 0.2 | — | — | 66 | 118 | 52 | 58 |
| 0.5 | — | — | 149 | 200 | 60 | |
| 1.0 | 66 | 108 | n.g | 488 | n.g | |
| 1.5 | 72 | 312 | — | — | — | |
| 2.0 | 116 | — | n.g | — | — | |
| 2.5 | d | n.g | — | n.g | — | |
| 3.0 | d | n.g | — | n.g | — | |
| Control | | | | | | |

注) d: S. aureus が死滅傾向を示した
n.g: S. aureus が完全に増殖を阻害された

2. 抗菌スペクトル

前記各熱水抽出物(対照地)を添加し常法により各種乳酸菌及び大腸菌への影響を試験した結果を下記第10表に要約して示す。

表から、当該熱水抽出物は主要な腸内細菌に対して不活性であると認められる。

第10表

| 抽出物 | L. フェーノニウム AD0002 | L. サリバリウス AD0001 | S. フェシウム AD1051 | S. フェシウム AD1050 | S. イクイナス AD8005 |
|------------|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 以数菌 | 以数菌 | 以数菌 | 以数菌 | 以数菌 |
| S. フェシウム | - | - | - | - | - |
| S. フェシウム | - | - | - | - | - |
| S. フェシウム | - | - | - | - | - |
| S. フェシウム | - | - | - | - | - |
| L. フェーノニウム | - | - | - | - | - |
| L. フェーノニウム | - | - | - | - | - |
| L. フェーノニウム | - | - | - | - | - |
| ビフィズス菌 | - | - | - | - | - |
| アシタロネ | - | - | - | - | - |
| 大腸菌 | - | - | - | - | - |

(注) - : 顕著なし, + : 12時間以内に最高生菌数, controlと変わらず, 増殖速度低下
* : 24時間以内に最高生菌数, controlと変わらず, 増殖速度低下
● : 24時間以降, 最高生菌数95%以上増着

3. 急性毒性

① ICR系マウス(雄6週令、平均体重31.0 ± 0.6g)を使用し、前記熱水抽出物の製法に従って得られた熱水抽出物をマウス当り9×10³、9×10⁴、9×10⁵個の3段階の出発菌数(各群10匹)に相当量でその生理食塩水0.5ml懸濁液を腹腔内投与し、14日間マウスの生死を観察した。Behrens-Kärber法に従って算出したLD₅₀値(mg/マウス)を第11表に示す。

尚、連日経口投与では、いずれの場合でも実質的に全然無毒性であった。

第11表

| | |
|------------------|------|
| L. サリバリウスAD0001 | 6.0 |
| L. フェーノニウムAD0002 | 10.8 |
| L. イクイナスAD8005 | 8.9 |
| S. フェシウムAD1051 | 7.3 |
| S. フェシウムAD1050 | 7.5 |

② ICR系マウス(雄6週令、平均体重30.0 ± 0.7g)を使用し、前記加熱滅菌体調製例に従って得られた滅菌体をマウス当り9×10³、9×10⁴、9×10⁵個の3段階の菌数相当(各群10匹)でその生理食塩水0.5ml懸濁液を腹腔

内投与し、14日間マウスの生死を観察した。Behrens-Kärber法に従って算出したLD₅₀値(菌体個数/マウス)は、いずれの菌にあっても6×10³個/マウス以上(腹腔内投与)であり且つ経口投与ではいずれの場合でも実質的に全然無毒性であった。

使用例

1. 菌 剤

| | |
|------------------|-------------|
| 第2リン酸カルシウム | 30~50 |
| グリセリン | 15~20 |
| カラギーナン | 0.5~20 |
| ラウリル硫酸ナトリウム | 0.8~1.5 |
| パラオキシ安息香酸ブチル | 0.001~0.005 |
| 香 料 | 0.5~1.5 |
| 本発明滅菌体(121℃加熱加圧) | 0.1~10 |

100重量%

2. 含 吸 剤

| | |
|---------------------|-------------|
| エタノール(90%) | 15~20 |
| サッカリン | 0.1~0.5 |
| ソジウムアシルタウレート | 0.2~0.6 |
| ゼラチン | 0.1~0.6 |
| 香料 | 0.5~1.5 |
| クロルヘキシジン | 0.002~0.007 |
| 本発明熱水抽出物(121℃, 25分) | 1.0~12.0 |
| 水 | 残部 |
| | 100重量% |

3. チューインガム

| | |
|---------|----------|
| ガムベース | 18~25 |
| 炭酸カルシウム | 1~5 |
| サッカリン | 0.05~0.2 |
| 乳 糖 | 65~75 |
| 本発明滅菌体 | 0.5~8 |
| | 100重量% |

4. う蝕予防性飲食物

パン、菓子、キャンデー、ヨーグルト、ジュース、茶類、コーヒー等々、任意の通常飲食物に対し本発明滅菌体乃至水抽出

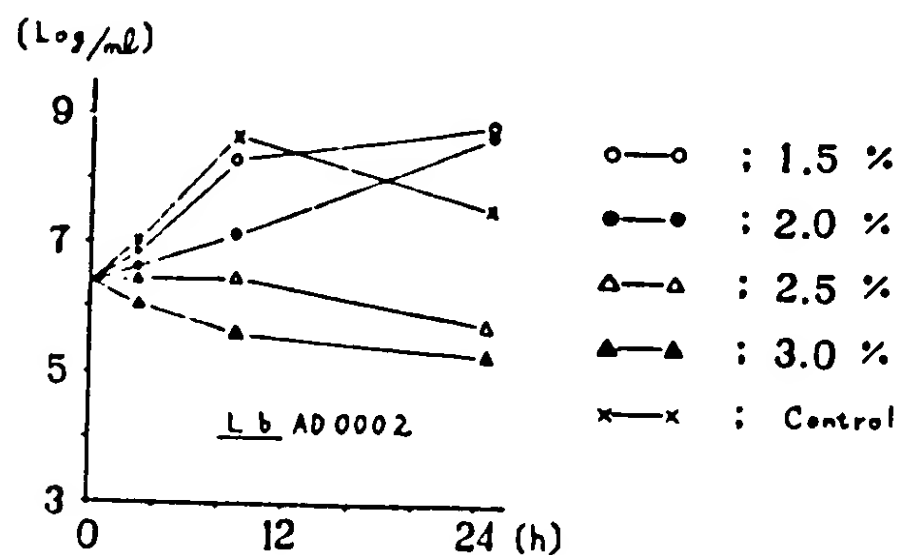
物を0.001~10重量%(乾燥物換算)程度添加することにより、う蝕予防性飲食物となし得る。

4. 図面の簡単な説明

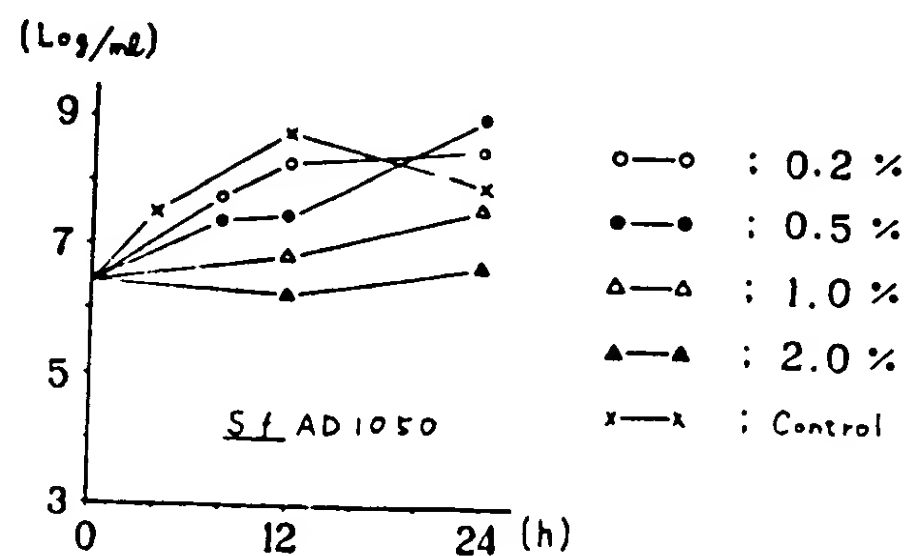
第1乃至5図は本発明実験例説明図である。

特許出願人 株式会社 アドバンス開発研究所

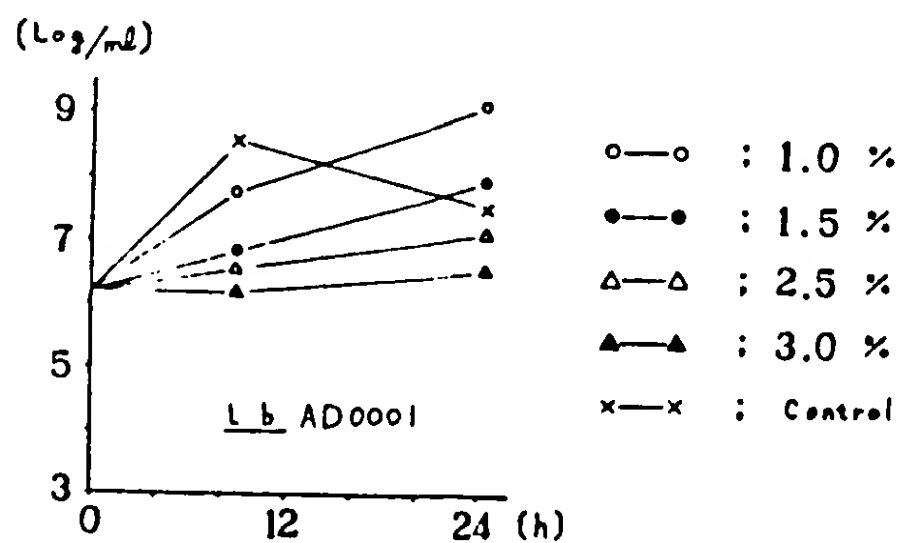
第 1 図



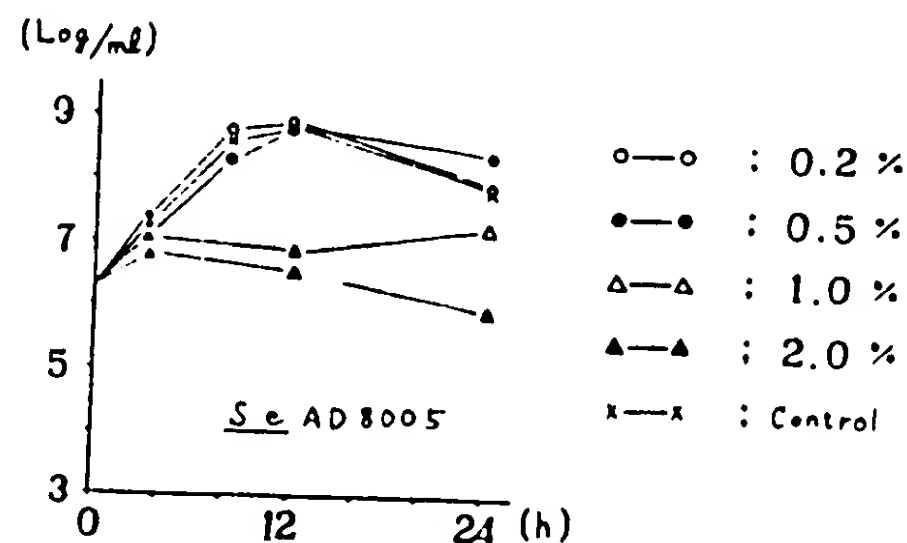
第 3 図



第 2 図

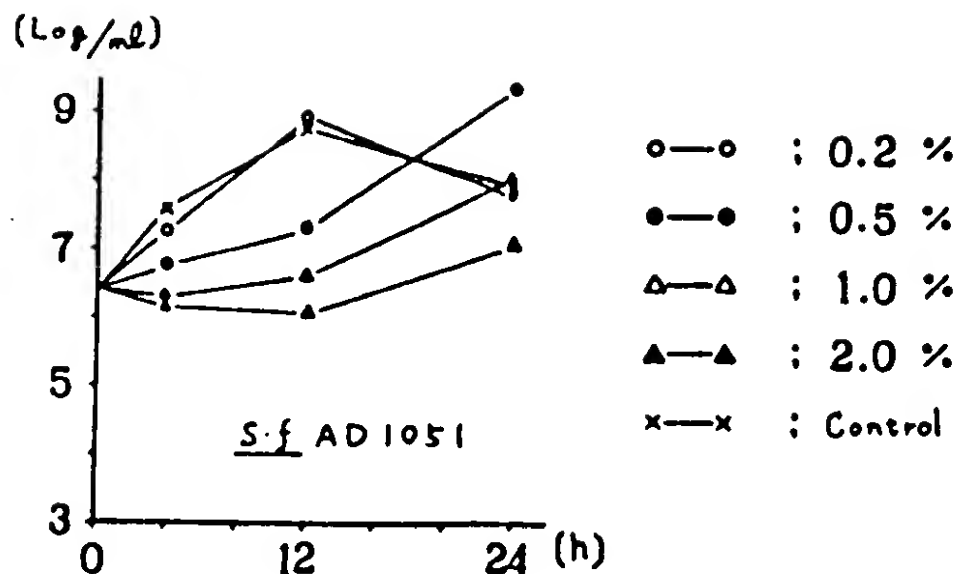


第 4 図



昭和60年3月6日

第5図



特許庁長官 志賀 学 殿

1. 事件の表示

昭和59年特許願第043829号

2. 発明の名称

抗う蝕剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒103 東京都中央区日本橋小舟町5番7号
(TEL 03-667-1551)

氏名 株式会社アドバンス開発研究所

代表取締役 浦 壁 伸 周



4. 補正の対象

明細書の[発明の詳細な説明]の欄

5. 補正の内容

- (1) 明細書第3頁第1行目から7行目第1表を下記の通りに訂正する。

第1表

| 菌 株 名 | 微生物受託番号 |
|----------------------|-------------|
| L. salivarius AD0001 | FERM BP-713 |
| L. fermentum AD0002 | “ “ -715 |
| S. equinus AD8005 | “ “ -716 |
| S. faecium AD1051 | “ “ -712 |
| S. faecium AD1050 | “ “ -714 |

- (2) 明細書第5頁第2行目「LBS agar粉末(BBL)」を

「LBS agar粉末(BBL)」と訂正する。

- (3) 明細書第5頁第3行目「pH 5.5 ± 2」を

「pH 5.5 ± 0.2」と訂正する。

- (4) 明細書第5頁第7行目「(197)55-(235)93」を

「(197)55-(239)97」と訂正する。

- (5) 明細書第5頁第9行目「M. Muti :」を「M. Mutai :

Microbiol. Immunol.」と訂正する。

- (6) 明細書第5頁第14行目「490-509」を「8th ed.

490-509, 1974」と訂正する。

- (7) 明細書第8頁第5表を別紙の通り訂正する。

- (8) 明細書第9頁第6表を別紙の通り訂正する。

- (9) 明細書第10頁第7表を別紙の通り訂正する。

- (10) 明細書第13頁第11行目「同・アシドフィラス」を「同・アシドフィルス」と訂正する。

- (11) 明細書第20頁第10表を別紙の通り訂正する。

受託番号変更届

昭和60年3月6日

特許庁長官 志 賀 孝 殿

1. 事件の表示

昭和59年特許願第043829号

2. 発明の名称

抗 う 蝕 剤

3. 手続をした者

事件との関係 特許出願人

住所 〒103 東京都中央区日本橋小舟町5番7号
(TEL 03-667-1551)

氏名 株式会社 アドバンス開発研究所

代表取締役 浦 壁 伸 周



4. 旧寄託機関の名称

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

5. 旧受託番号

微工研菌寄第7536号
(FERM P-7536)

微工研菌寄第7537号
(FERM P-7537)

微工研菌寄第7538号
(FERM P-7538)

微工研菌寄第7539号
(FERM P-7539)

微工研菌寄第7540号
(FERM P-7540)

6. 新寄託機関の名称

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

7. 新受託番号

微工研条寄第712号
(FERM BP-712)

微工研条寄第713号
(FERM BP-713)

微工研条寄第714号
(FERM BP-714)

微工研条寄第715号

(FERM BP-715)

微工研条寄第716号

(FERM BP-716)

8. 添付書類の目録

(1) 新受託番号を証明する書面

5通

(受託証の写)